Arnaldoa 19(2): 195 - 202, 2012 ISSN: 1815 - 8242

Efecto del glifosato a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre el índice mitótico y de fases en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa L*

Effect of glyphosate at different concentrations and exposure times on mitotic index and phase in meristematic cells of root tips of *Allium cepa* L

José Luis Castillo Zavala, Irene Consuelo Julca Chávez, José María Castillo Zavala, Jorge Elias, Castro Silupú, José Antonio Saldaña Jiménez.
Laboratorio de Fitogenetica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, PERÚ. *castillo_zavala_jl@hotmail.com*

Resumen

En el presente trabajo, se determinó el efecto del glifosato a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre el índice mitótico y de fases, en células meristemáticas de ápices radiculares en *Allium cepa L*. Se utilizaron bulbos que fueron colocados en vasos de tecnopor con agua, en condiciones de oscuridad y aireación constante. Cuando las raicillas alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm; se trasladaron a soluciones que contenían Glifosato a concentraciones de 15, 30 y 45 ppm durante 6, 12 y 24 horas de exposición. Otro grupo de bulbos no fueron expuestos al Glifosato, los cuales constituyeron el control. Posteriormente se procedió a cortar las raicillas, para realizar el análisis citológico y determinar así los índices mitóticos y de fases. Los valores obtenidos en las diferentes concentraciones de Glifosato, fueron comparados con los del grupo control. Observando una disminución en el índice mitótico, hasta alcanzar valores de 5.75 % a la concentración de 45 ppm durante 24 horas de exposición. En relación al índice profásico, se evidenció un incremento, hasta alcanzar valores de 76.52 % a la concentración de 45 ppm durante 24 horas de exposición. Dicho aumento, generó un aumento en el índice metafasico y una disminución en los índices anafásico y telofásicos. Los estadísticos de los resultados, se realizaron, mediante el análisis de varianza que mostró la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ensayados; lo cual fue confirmado mediante la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey.
Palabras clave: Glifosato, Índice mitótico, *Allium cepa L.*

Abstract

In this study, we determined the glyphosate effect at different concentrations and exposure times on mitotic index and phase index in meristematic cells of root tips of *Allium cepa* L. We used the bulbs, which were placed in styrofoam cups with water, in conditions of darkness and constant aeration. When the rootlets reached a length of 2 to 3 cm, were transferred to solutions with glyphosate at concentrations of 15, 30 and 45 ppm during 6, 12 and 24 hours of exposure. Another group of bulbs were not exposed to glyphosate, which formed the control. Then, they proceeded to cut the rootlets for cytological analysis and determine mitotic index and phase index. The values obtained in the different concentrations of glyphosate were compared with the control group. Noting a decline in mitotic index until reaching values of 5.75% at concentration of 45 ppm to 24 hours of exposure.In relation to the phase index, were evidenced a increase, reaching values of 76.52% at concentration of 45 ppm to 24 hours of exposure. This increase generated an increase on metaphasic index and a decrease in anaphasic index and telophasic index.The analysis of variance showed significant differences between the different treatments tested, which was confirmed by multiple comparison test of Tukey.
Key words: Glyphosate, mitotic index, *Allium cepa* L.

Introducción

Un herbicida es un pesticida utilizado para matar plantas indeseadas. Los herbicidas son contaminantes que constituyen una amenaza potencial a la salud. Estos compuestos han sido ampliamente empleados en diversas partes del mundo para controlar una variedad de malezas. La exposición a estos compuestos químicos, afecta de forma primaria a los trabajadores que intervienen en su producción industrial. En zonas agrícolas también puede tener lugar la exposición de otros trabajadores, que entran en campos tratados, o de la población general, que vive en la proximidad de áreas aplicadas. Sin embargo el uso de estos herbicidas, puede tornarse irracional debido a muchos factores como el conocimiento inadecuado de su dosificación y aplicación por parte de los agricultores, entre otros (Andrew, *et al.*, 1981; Seeger, *et al.*, 2000; Korte, 1982; Tjio & Levan.1950;Saez, 1978; Anhaya, 1981; Kmirova, 1980).

Los herbicidas actúan generalmente inhibiendo los procesos metabólicos relacionados con el crecimiento y desarrollo de las malas hierbas, además no son selectivos y matan toda planta con la que entra en contacto (Tomlin, 2000; Ware & Whitacre, 2004).

El Glifosato (N-(fosfonometilo) glicina / C3H8NO5P), ha sido ampliamente utilizado en diversas partes del mundo para controlar una variedad de malezas. Este es un herbicida organofosforado absorbido por las hojas y no por las raíces es de amplio espectro y no selectivo; desarrollado para la eliminación de hierbas y arbustos, en especial los perennes. Ejerce su toxicidad sobre toda clase de vegetación pre emergente. Se aplica al suelo o al follaje, es absorbido y transportado a toda la planta. (Anhay *et al.*, 1981, Kmirova, 1980). Su Mecanismo de acción se debe a que actúa inhibiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), por parte de la planta. Este herbicida es un potente inhibidor de la enzima 5 - enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa o EPSPS, enzima muy importante en la ruta metabólica del Shikimato, presente solo en bacterias, hongos y plantas, mediante la cual se producen muchos compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, ácidos benzoicos, isoflavonas (fitohormonas), entre otros, además de algunas enzimas para la síntesis de proteínas. De hecho, hasta un 20% del carbono que es fijado durante el proceso de fotosíntesis es utilizado en esta ruta metabólica (Kmirova, 1980; Dubach, 1986; Talledo & Carola, 1995).

Debido a que los seres humanos no comparten esta ruta metabólica con los vegetales, es considerado como de bajo riesgo para la salud de los mismos. Sin embargo, investigaciones realizadas en herbicidas organoclorados indican que produce aberraciones cromosómicas, empleando como agente el herbicida acido 2,4-diclorofexiacetico (2,4D), auxina sintética producto de la substitución con halógenos en las posiciones 2 y 4 del anillo fenílico del ácidofenoxiacético; el cual se distribuye comercialmente bajo nombres de U-46, Hedonal, Malezan, que fue ampliamente empleado con fines estratégicos durante la guerra de Vietnam (Korte, 1982; Mims, 1999; Spigel, 1982; Steel & Torrie, 1993).

Se sabe que el ciclo celular, no siempre termina en la división celular y que su regulación genética, condiciona a cada una de las fases que lo conforman. Exige una transcripción y síntesis de proteínas específicas previas. Estas proteínas determinan el inicio del ciclo celular, la replicación, la finalización del período S, el paso de G2 hacia la mitosis y el flujo de cada fase de esta última. De esta manera, este ciclo puede ser afectado por sustancias antimitóticas, citotóxicas y genotóxicas que alteren su normal desarrollo e induzcan la aparición de figuras mitóticas anormales e incluso ocasionen daños a nivel cromosómico (Alberts, *et al.*, 2006; Paniagua, 1998; Beltrán & González, 1995; Ito, 2000; Pelayo, 2003; Losada & Hirano, 2001)

En 1938 el uso de *Allium cepa* se introdujo como un sistema de prueba biológico para evaluar los efectos citogenéticos de la colchicina. Desde entonces ha sido un material biológico de amplio uso en pruebas de laboratorio, debido al crecimiento rápido de sus raíces y la respuesta de su material genético a la presencia de citotóxicos potenciales en los líquidos de prueba; siendo de esta manera frecuentemente utilizados sus meristemos,

para estudios de dinámica celular, ya que constituyen un sistema *in vitro* ideal para estudiar los mecanismos regulatorios que puedan afectar el ciclo celular (Saez, 1978; Losada & Hirano, 2001; Dubinin, 1981).

Al no existir trabajos referentes a la acción de herbicida organofosforado glifosato sobre el ciclo celular en vegetales, en el presente trabajo se determinó el efecto que ejerce a diferentes concentraciones y tiempo de exposición sobre el índice mitótico y de fases en células meristemáticas de ápices radiculares *de Allium cepa L.*

Material y Métodos

Material Biológico

Bulbos de *Allium cepa* L. "cebolla" Variedad Roja Arequipeña, procedentes de la Provincia de Otuzco. Departamento de La Libertad.

Obtención de las raicillas

Se seleccionaron bulbos de "cebolla", tomándose en cuenta los siguientes criterios de inclusión: forma de disco germinativo, color rojo- rosado, consistencia dura, peso entre 60 y 80g en buen estado fitosanitario, acumulándose 120 bulbos. En los bulbos seleccionados se procedió a eliminar las catáfilas y raicillas secas, también se realizó la limpieza cuidadosa del disco radicular.

En la parte ecuatorial de cada bulbo, se introdujeron 4 mondadientes distribuidos equidistantemente para sostener el bulbo a nivel de la boca del vaso de tecknopor de 100ml el cual previamente se llenó con 80 ml de agua, esto permitió que el líquido se ponga en contacto con el disco germinativo para que se produzca la emisión de nuevas raicillas, necesarias para la experiencia. Los bulbos se mantuvieron en un sistema al cual se proporcionó aireación artificial a razón de 10 – 20 ml/min a una temperatura de 20Cº ± 5Cº, en completa oscuridad, renovando el agua cada 24 horas. Después de 72 horas se seleccionaron los bulbos que originaron más de 15 raicillas con longitud promedio de 2 a 3 cm a fin de asegurar la presencia de células con una cinética mitótica constante.

Los bulbos enraizados, fueron separados en cuatro grupos. El primer grupo, se utilizó para el tratamiento control (no expuesto al Glifosato) y los tres restantes expuestos a soluciones acuosas de Glifosato en concentraciones de 15, 30 y 45 ppm; durante 6, 12 y 24 horas, para cada una de estas concentraciones.

A las 6 horas de exposición de las raicillas del grupo control y de cada uno de los tratados con Glifosato; se procedió a seleccionar dos raicillas, las cuales luego de ser lavadas tres veces con agua potable, se colocaron en la solución Carnoy`s. Posteriormente los bulbos fueron retornados a cada una de sus respectivas soluciones para realizar el mismo procedimiento a las 12 y 24 horas respectivamente.

Obtención de Preparados Citológicos

Las raicillas fijadas en Carnoy`s fueron extraídas y lavadas tres veces en agua potable para retirar los restos del fijador. Luego se procedió a secarlas con papel. En seguida, éstas fueron depositadas sobre una luna de reloj para su coloración de acuerdo a la técnica rápida de Tjio y Levan (Tjio & Levan, 1950; Saez, 1978).

Posteriormente las células fueron observadas en el microscopio con el objetivo de 100x y se realizó el contaje de 2,000 células meristemáticas de cada uno de los diferentes tratamientos con dos repeticiones, mediante la técnica de barrido, para identificar las fases del ciclo celular y determinar los índices mitóticos y de fases.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos a partir del conteo de células de los diferentes tratamientos, fueron recolectados y organizados en tablas procediéndose luego a la estimación del análisis de varianza y la posterior comparación múltiple de promedios, mediante la prueba de Tukey .

Resultados

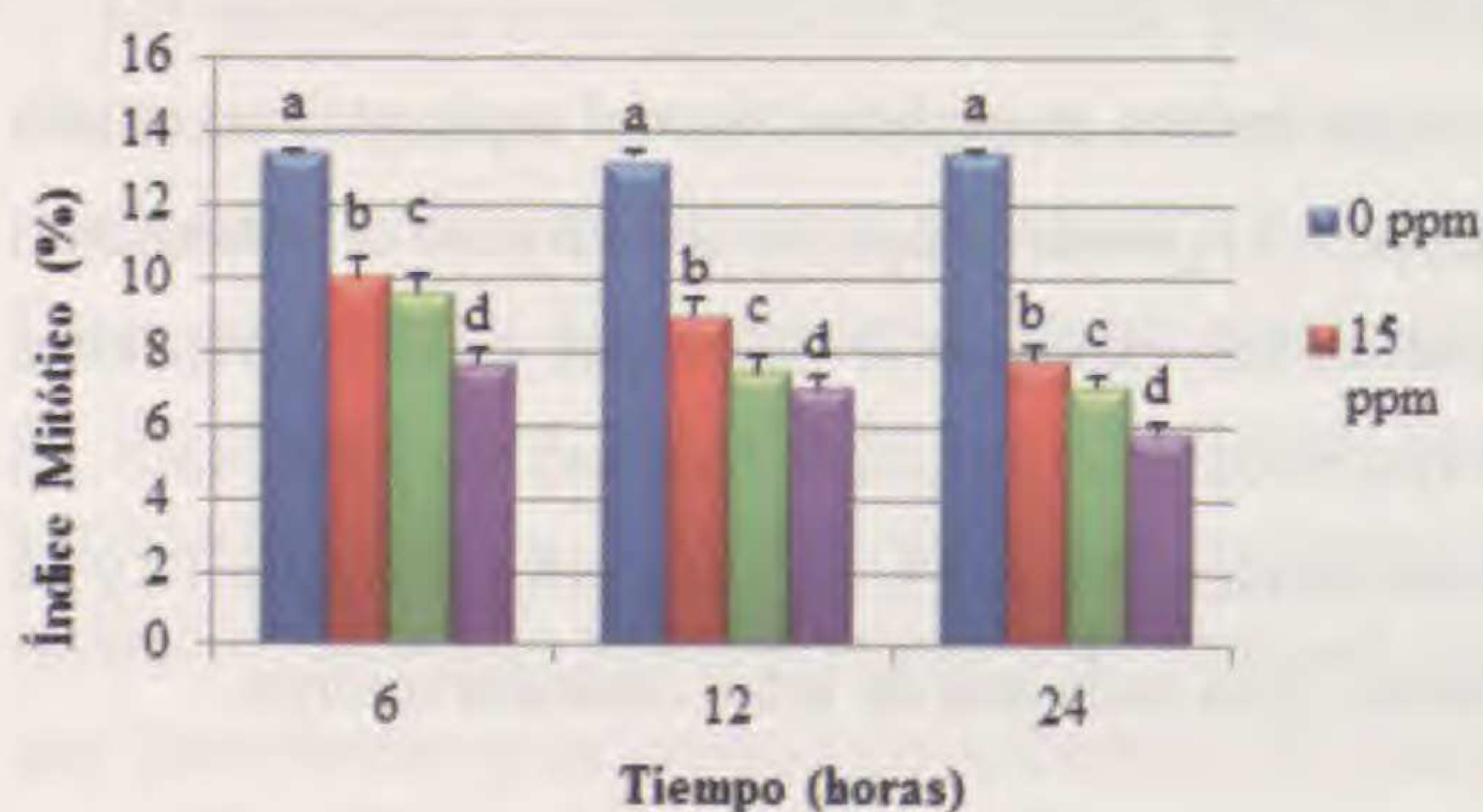


Fig. 1. Índice Mitótico en células meristemáticas del tejido radicular de *Allium cepa* L, expuestas a las diferentes concentraciones de glifosato durante 6; 12 y 24 horas.Los valores representan el promedio de tres repeticiones, las barras verticales indican el error estándar. Los promedios marcados con la misma letra no son diferentes significativamente.



Fig. 2. Diferentes fases del ciclo celular en célulasmeristematicas en ápices radiculares de *A. cepa* L. no expuestas al glifosato. (100X) (i) Interfase, (p) Profase, (m) Metafase, (a) Anafase, (t) Telofase.

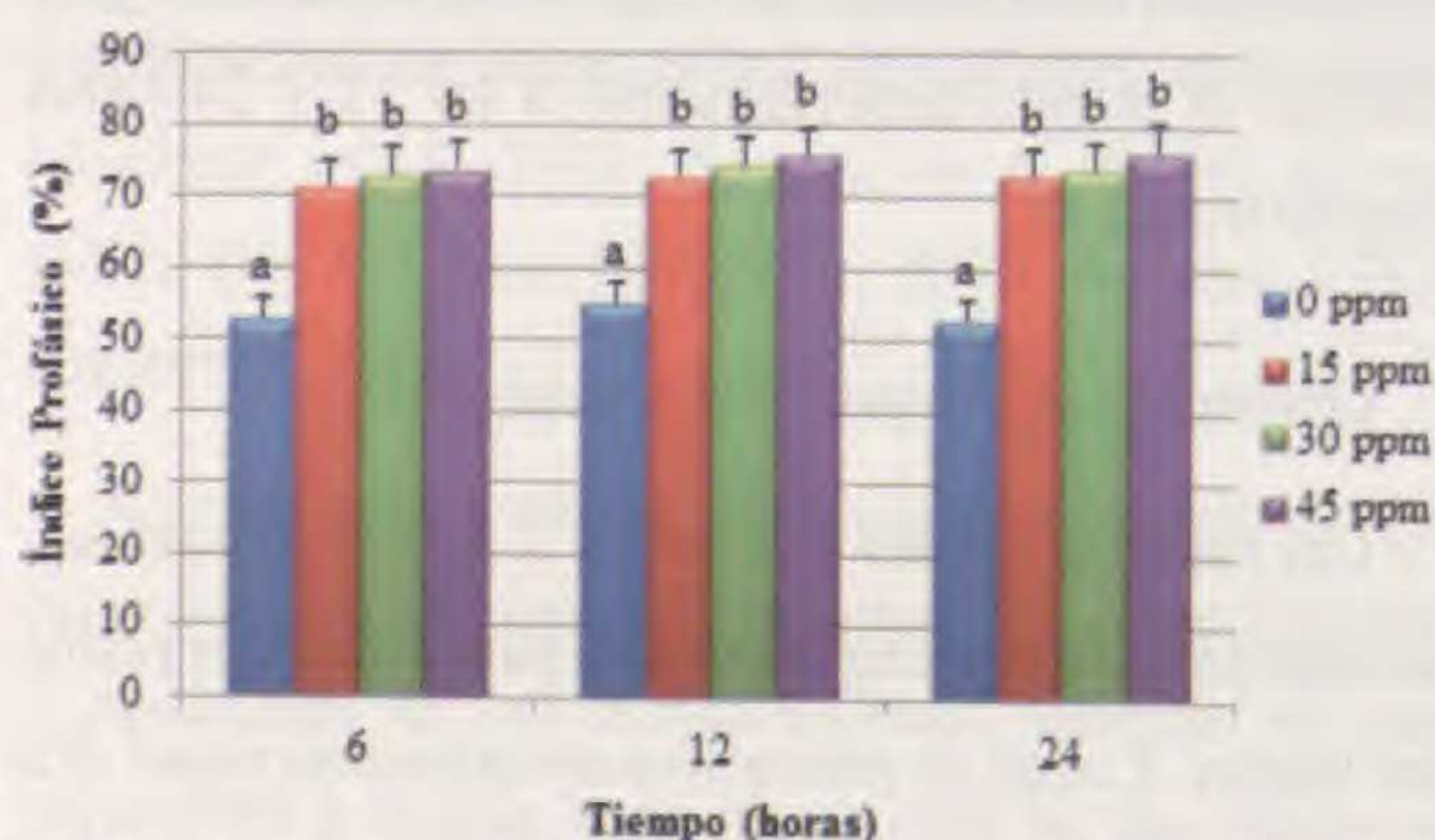


Fig. 3. Índice Profásico de células meristemáticas de ápices radiculares en *A. cepa* L, expuestas a las diferentes concentraciones de glifosato durante 6; 12 y 24 horas.Los valores representan el promedio de tres repeticiones, las barras verticales indican el error estándar. Los promedios marcados con la misma letra no son diferentes significativamente.



Fig. 4. Células meristemáticas en Profase (p) de ápices radiculares en *A. cepa* L. no expuestas al glifosato.



Fig. 5. Células meristemáticas en Profase (p) de ápices radiculares en *A. cepa* L. expuestas al glifosato en una concentración de 30 ppm durante 24 horas (100x).

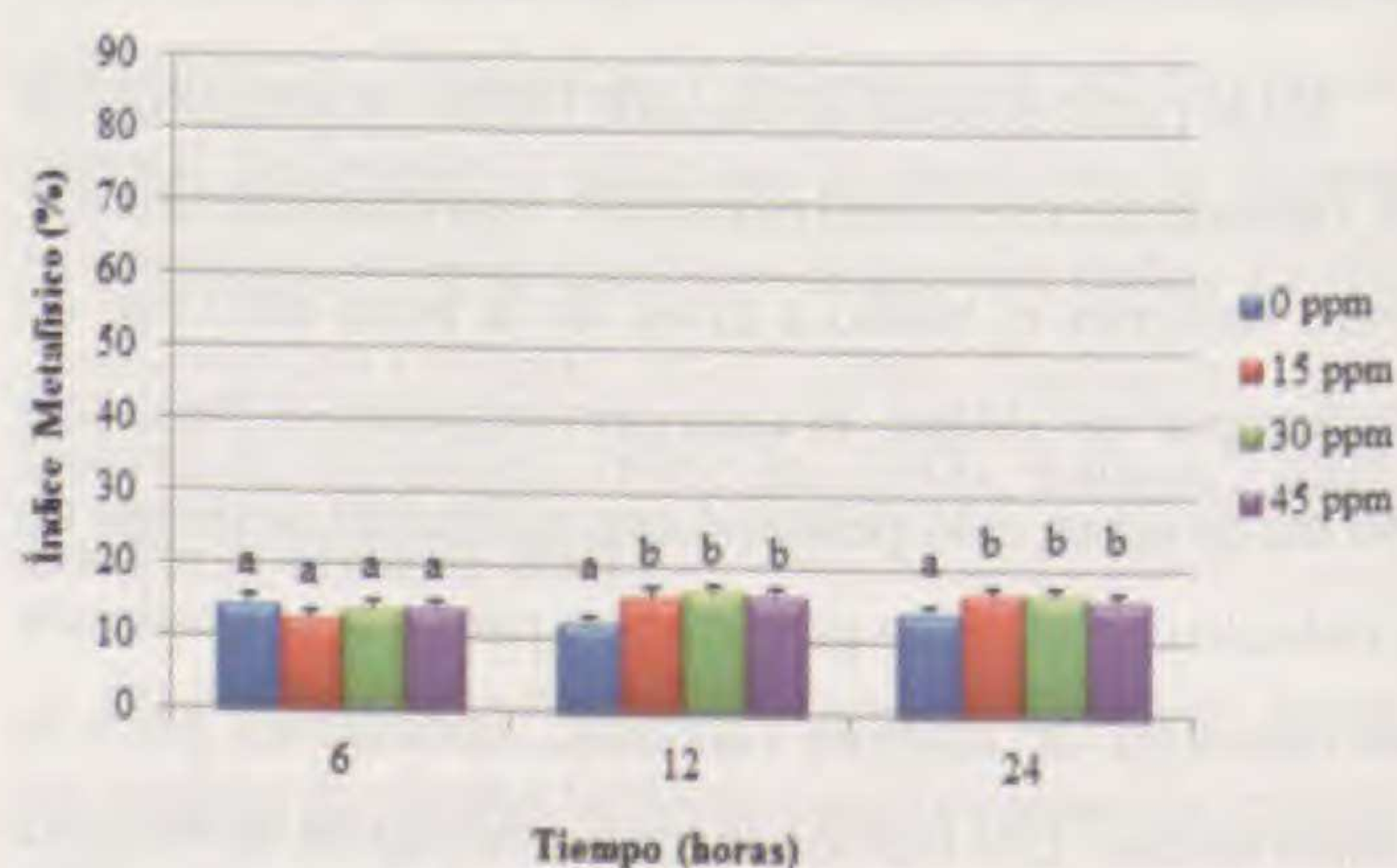


Fig. 6. Índice Metafasico de células meristemáticasen ápices radiculares de *Allium cepa* L, expuestas a las diferentes concentraciones de glifosato durante 6; 12 y 24 horas.Los valores representan el promedio de tres repeticiones, las barras verticales indican el error estándar. Los promedios marcados con la misma letra no son diferentes significativamente.

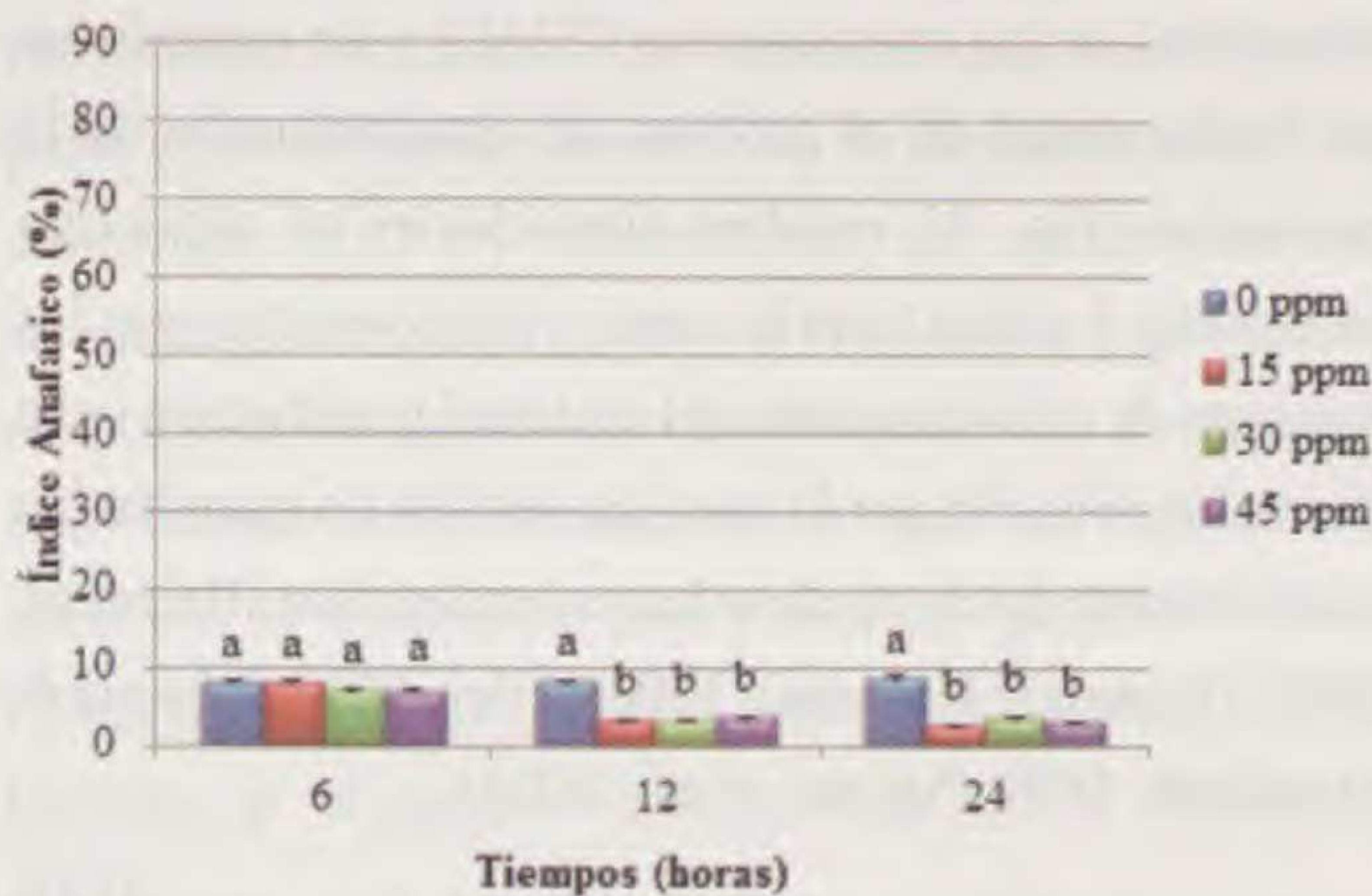


Fig. 7. Índice Anafasico de células meristemáticasde ápices radiculares en *A. cepa*. L, expuestas a las diferentes concentraciones de glifosato durante 6; 12 y 24 horas.Los valores representan el promedio de tres repeticiones, las barras verticales indican el error estándar. Los promedios marcados con la misma letra no son diferentes significativamente.



Fig. 8. Células meristemáticas en Anafase (a) deápices radiculares en *A. cepa L*. no expuestas al glifosato.

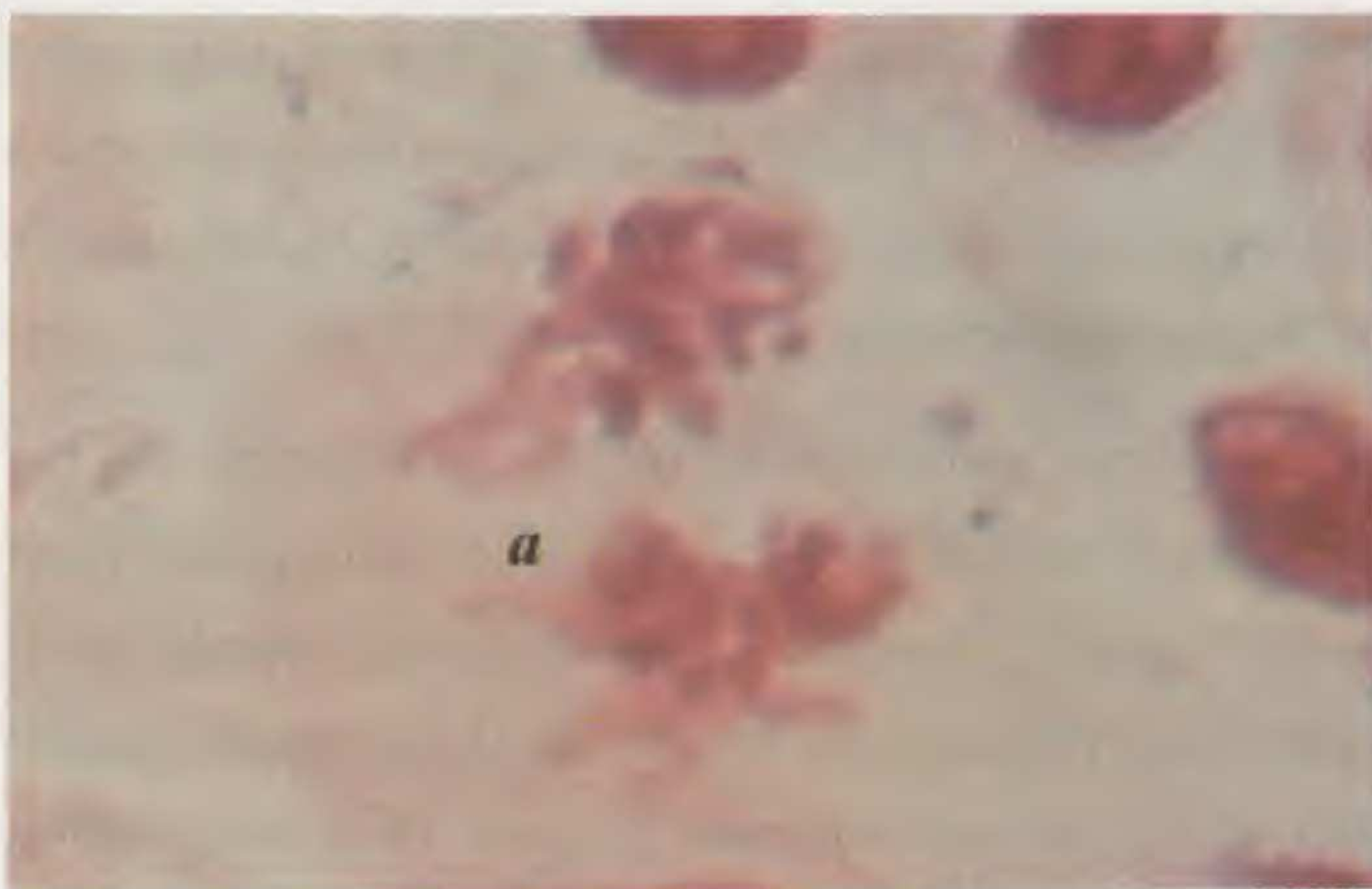


Fig. 9. Células meristemáticas en Anafasico (a) de ápices radiculares en *A. cepa* L.expuestas al glifosato en una concentración de 45 ppm durante 24 horas (100x).

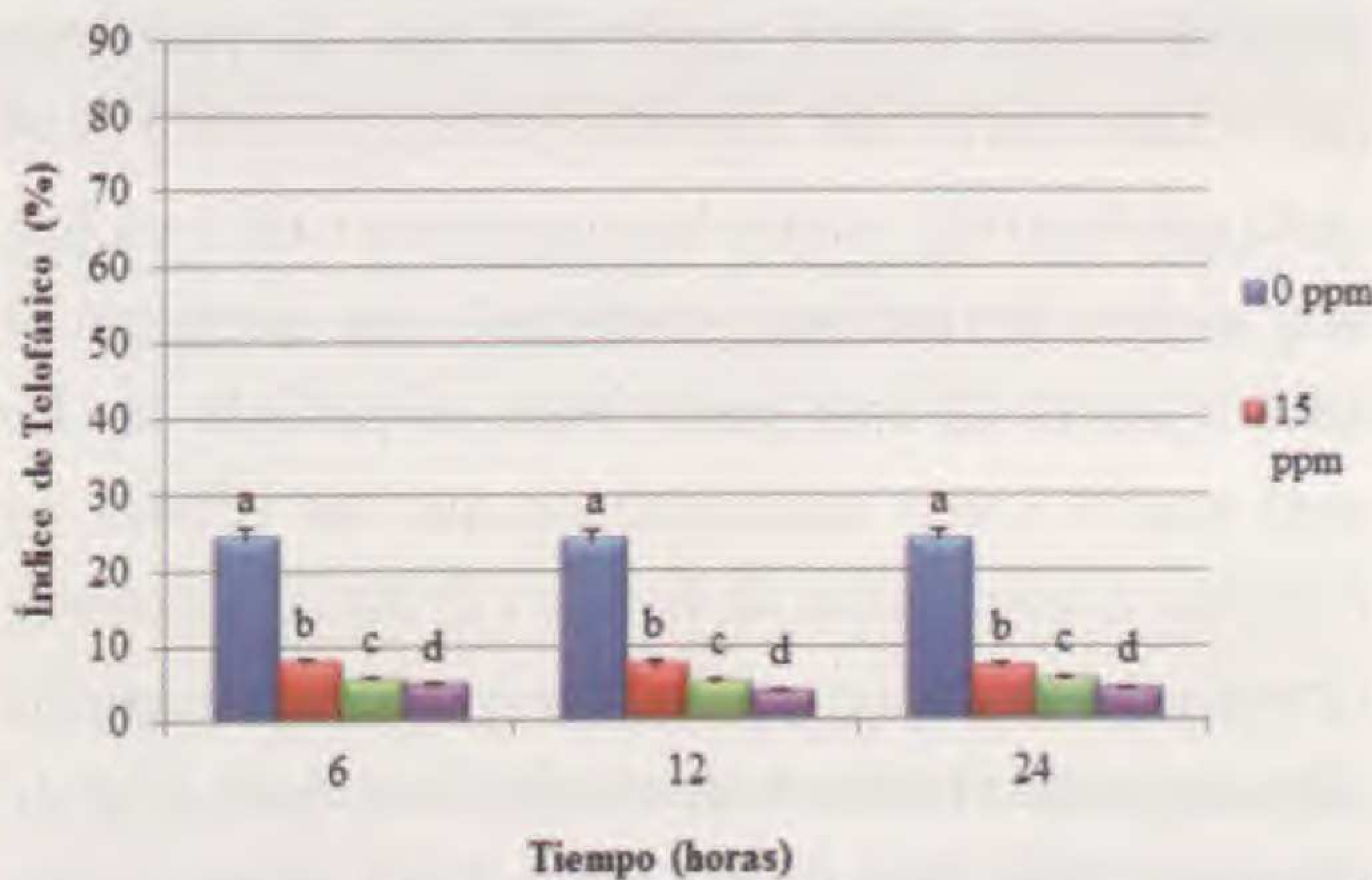


Fig. 10. Índice de Telofásico de células meristemáticas del tejido radicular de *A. cepa* L., expuestas a las diferentes concentraciones de glifosato durante 6; 12 y 24 horas. Los valores representan el promedio de tres repeticiones, las barras verticales indican el error estándar. Los promedios marcados con la misma letra no son diferentes significativamente.

Discusión

Los meristemos radiculares de *Allium cepa* L, son muy convenientes para estudiar la división celular puesto que hay de 10 a 15% de células en mitosis; además de esto, una variedad de compuestos químicos y factores fisicos han sido ensayados en estos meristemos, con la finalidad de conocer los eventos celulares y moleculares que se llevan a cabo durante el ciclo celular (Belmont, 2002; Dubinin, 1981; Daniel, 2004).

Cuando un bulbo se rehidrata, se produce una estimulación en la división de las células, lo cual permite una elongación de las raíces de la planta. La población de células meristemáticas se encuentra sujeta a un equilibrio dinámico estable; hallándose asincrónicamente distribuidas a través del ciclo (Felix & Karsenti, 1995; Shimotohno, 2003).

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los diferentes tratamientos con glifosato para los IM se observa que los valores van disminuyendo conforme se incrementan las concentraciones, en la prueba de comparación Múltiple de promedios (Fig. 1), se observa la formación de cuatros grupos estadísticamente homogéneos en función a su efecto. Debido a que posiblemente, conforme se incrementa las concentraciones de glifosato, el daño que se encarga de hacer posible el normal tránsito de las células

de la interfase a la mitosis es mayor; esto trae como consecuencia las diferencias en los índices mitóticos.

Esta disminución de los IM se debería a que probablemente el glifosato a las concentraciones y tiempos ensayados; actuaría inhibiendo la síntesis de animoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), por parte de la planta, debido a que es un potente inhibidor de la enzima 5 - enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa o EPSPS, enzima muy importante en la ruta metabólica del Shikimato, mediante la cual se producen muchos compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, ácidos benzoicos, isoflavonas (fitohormonas), entre otros. Además de algunas enzimas necesarias para la síntesis de proteínas. Esta inhibición en la síntesis de aminoácidos mencionada anteriormente, estaría generando que las proteínas que actúan a nivel del segundo punto de control en el ciclo celular (G2), como los complejos CdK1-ciclina A y ciclina B (ciclinas mitóticas); que permiten el paso a través de este punto hacia el período M. Lo cual traería como consecuencia que las células no transiten normalmente de la fase G2 hacia la mitosis; deteniéndose entonces en interfase y consecuentemente disminuyendo el número de células en división (Fig.2). (Dubach, 1986; Talledo & Carola, 1995, Mims, *et al.*, 1999; Ito, 2000; Dubinin, 1981; Daniel, 2004; Celada, 1996).

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los diferentes tratamientos con glifosato para los IP, se observa que los valores aumentan, en la prueba de comparación múltiple de promedios (Fig. 3), se observa la formación de dos grupos estadísticamente homogéneos en función a su efecto. Debido a que las diferentes concentraciones de glifosato ensayadas estarían produciendo un daño similar en la estructura de las moléculas que controlan el normal tránsito de las células de la profase a la metafase.

Este incremento del IP en los tratamientos expuestos al glifosato, se debería probablemente a que como se mencionó anteriormente dicho compuesto al inhibir la síntesis de aminoácidos necesarios para la síntesis de algunas proteínas como las condensinas; las cuales a su vez se encargan del mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC) y de cumplir un rol fundamental en el proceso de condensación de la cromatina (Fig. 4), resulten alteradas en su estructura molecular. Lo que traería como consecuencia que los procesos de condensación del material genético se vean afectados (Fig. 5); por lo que, las células no transitarían normalmente desde profase hacia la metafase (Belmont, 2002; Hyman & Karsenti, 2003; Aller, 1992; Murria & Kirschner, 1991,Purves, *et al.*, 2003).

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los diferentes tratamientos con glifosato para los I Met, se observa que los valores aumentando, en la prueba de comparación múltiple de promedios (Fig 6), se observa la formación de dos grupos estadísticamente homogéneos en función a su efecto. Debido a que las diferentes concentraciones de glifosato ensayadas estarían produciendo un daño similar en la estructura de las moléculas que controlan el normal tránsito de las células de la metafase a anafase.

El ligero aumento del índice metafásico, de los diferentes tratamientos con glifosato con respecto al grupo control, se debería a que dicho compuesto al alterar la estructura molecular de las condensinas, no permitiría llevar a cabo un proceso de condensación normal del material genético, como es característico de la metafase, lo que traería como consecuencia que las células no transiten normalmente desde la metafase hacía la anafase (Jiménez & Merchant, 2003; Purves, *et al.*, 2003; Murria & Kirschner, 1991; Hyman & Karsenti, 2003).

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los diferentes tratamientos con glifosato para los IA, se observa que los valores disminuyen, en la prueba de comparación múltiple de promedios (Fig. 9), conformándose dos grupos estadísticamente homogéneos en función a su efecto. Debido a que las diferentes concentraciones de glifosato ensayadas estarían produciendo un daño similar en la estructura de las moléculas que controlan el normal tránsito de las células de anafase a la telofase.

Esta disminución en el IA, estaría ocurriendo debido al ligero aumento del índice metafásico mencionado anteriormente. Por otro lado, el glifosato al actuar

inhibiendo la síntesis de aminoácidos que forman parte de la estructura molecular de proteínas como las cohesinas, MAPs y catastrofinas; las cuales a su vez se encargan de llevar a cabo el proceso de segregación de cromátidas hermanas característico de la anafase. Esto traería como consecuencia, que las células no transiten normalmente desde anafase hacia la telofase (Weingartner, *et al*., 2003; Felix & Karsenti, 1995; Hyman & Karsenti, 2003; Celada, 1996; Paniagua, 2000).

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los diferentes tratamientos con glifosato para los IT, se observa que los valores disminuyen, en la prueba de Comparación Múltiple de promedios (Fig. 10), conformándose cuatro grupos estadísticamente homogéneos en función a sus efectos. Esto se debería probablemente a que el glifosato a las diferentes concentraciones, ocasionan una severa alteración en la estructura de las moléculas que controlan los eventos que normalmente deben ocurrir en esta fase alterando el tránsito normal de telofase a interfase.

La disminución del IT, se originaría debido a que el proceso de segregación cromosómica está siendo afectado, un número reducido de células pasarían hacía la telofase; lo que explicaría el bajo índice telofásico hallado (Jiménez & Merchant 2003; Purves, 2003; Hyman & Karsenti, 2003).

Al evaluar los Índices Mitóticos (IM), Profásicos (IP), Metafásicos (I Met.), Anafásicos (IA) y Telofásicos (IT) en células meristemáticas de los tratamientos control, se hallaron valores de 13.425 %, 13.175 % y 13.45 % para IM, 52.885 %, 55.305 % y 52.93 % para IP, 14.755%, 12.52% y 14.34% para I. Met, 8.03%, 8.18% y 8.555% para IA y 24.335%, 23.995% y 24.18% para IT a 6, 12 y 24 horas respectivamente. Dichos valores se aproximan a lo reportado por Beltrán & Gonzáles, los cuales estimaron un IM de 14.6%, IP de 44.60%, I Met de 15.40%, IA de 9.20% y IT de 28.80%. Esto se debería probablemente a la influencia de factores ambientales; lo cual explicaría la ligera variación en los valores de los índices mitóticos hallados (Beltrán & González, 1995; Paniagua, 1998).

Conclusiones

Glifosato ocasiona una disminución en los índices mitóticos conforme se incrementa su concentración y tiempo de exposición, en células meristemáticas de ápices radiculares en *Allium cepa* L.

Glifosato ocasiona un aumento en índice profásico y metafásico, en células meristemáticas de ápices radiculares en *Allium cepa*L.

Los índices de anafase y telofase, disminuyen significativamente, en células meristemáticas de ápices radiculares en *Allium cepa* L.

Literatura citada

Andrew, R.; S. Collins & R. Jonson. 1981. Use of metabolic inhibitors in repair studies. Friedberg & Huanawanlt eds, En DNA Repair. New York.Vol I, p.p.341-360.

Alberts, B; A. Jonson; J. Lewis; M. Raff; K. Roberts & P. Walter. 2006. Biología Molecular de la Célula. Cuarta edición. Ediciones Omega. España.

Aller de La Torre. 1992. The involvement of discrete genome regions in post – mitotic chromosome decondensation in G1 timing in *Allium cepa* L. meristematic cells. Journal of Cell Science 103: 1047-1051.

Anhaya, S.M.; R.J Monroe & F. E. Guthrie. 1981. Absorption and distribution of intubated insecticides in fasted mice. Prestic. Biochem.Physiol 16(1):18-46.

Beltrán, R. & L. González. 1995. Inducción de puentes cromosómicos permanentes en meristemos de *Allium cepa*. Rebiol 15 (1-2):9-17.

Belmont, L. D.; A. A. Hyman; R. E. Sawin & T.J. Mitchison. 2002. Real –time visualization of cell cycle – dependent changes in microtubule dinamics in cytoplasmic extracts.Cell 62:579- 589.

Celada, A. 1996. Factores de transcripción y control de la expresion génica. Investigación y Ciencia, Nro. 179.

Dubinin, N.1981.Genética General. Tomos I y II .Edit. MIR.Moscú.

Daniel, W. 2004. Análisis de la variancia. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4° Edic. Limusa Wiley. México.755 pp.

Dubach, P. 1986. Efectos y Principios de Selectividad de los Herbicidas. Edit. CIBA.GEIGY.S.A. Basilea. Suiza.

Dubinin, N.1981.Genética General. Tomos I y II .Edit. MIR. Moscú

Felix, M. & E. Karsenti. 1995. La división celular. Mundo Cientifico. Nro 154, vol.15

Hyman, A. & E. Karsenti. 2003. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. Cell 84. 401 – 410.

Jiménez, L. & H. Merchant. 2003. Biología Celular y Molecular. Primera Edición. Editorial Prentice Hall. México DF.

Kmirova, N. 1980. Methods for determination of exposure of agricultural workers to pesticides,In : Tordoir, WF & Van Heemstra- Lequin, E.A.H. , ed . Field worker exposure during pesticide application, Amsterdam, Oxford, New York, Elsevier Scientific Publishers, 169 -172.

Korte, C. & S. Jalal. 1982. 2,4-D Induced Exchanges in cultured Limphocytes, Journal of Heredity. 73:224-226.

Murria, A. & M. Kirschner. 1991. Control del ciclo celular. Investigación y Ciencia, Nro 176.

Mims, C; J. Playfair; I. Roitt; D. Wakelin & R. Willians. 1999. Microbiologia Médica. 2ª ed. Ed. Harcourt Brace. Madrid – España.

Losada, A. & T. Hirano. 2001. Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. Bioessays 23: 924 – 935.

Paniagua, R. A. 1998. Citología e Histología Vegetal y Animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales. Tercera Edición.Mc Graw-Hill. Interamericana.

Ito, M. 2000. Factors controlling cyclin B expresión. Plant Mol. Biol. 43: 677- 690.

Pelayo, H. R.; J. Pincherira; A. Jiménez; J. F. Clarke & C. De la Torre. 2003. Independent checkpoint control in a plant cell model. Biol. Res. 36:381- 388.

Saez, F.A. 1978. Citogenética básica y biología de los cromosomas. Organización de los Estados Americanos. Washington D.C. Serie de Biología. Monog. N° 20.

Spigel, M. 1982. Teoría y Problemas de Probabilidades y Estadísticas. Serie de compendios Shawn. Editorial Mc. Graw Hill. México. 372p.

Steel, R. & J. Torrie. 1993. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da. edición. Editorial Mc. Graw Hill S.A. México.

Shimotohno, A.; S. Matsubayashi; M. Yamaguchi; H. Uchimya & M. Umeda. 2003. Differential phosphorylation activities of CDK – activating Kinases in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 534.

Talledo, D. & E. Carola. 1995. El ciclo Celular en vegetales. Biotempo 2: 13 – 31.

Tjio & Levan.1950. The use of oxiquinolina in chromosome analysis. Ann Est Aula Dei: 2:21-64.

Tomlin, C. 2000. The Pesticide Manual, 12th Ed.British Crop Protection Council. Blackwell Sci Publications, Cambridge, Massachusetts. 1250pp.

Ware, G. W & D. M. Whitacre. 2004. The Pesticide Book, 6th ED. Meister Media Worldwide. 496 pp.

Weingartner, M; H. R. Pelayo; P. Binarova; K. Zwerger; B. Melikant; C. De La Torre; E. Heberle-Bors & L. Bogre. 2003. A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expresion shorten G2 –phase and alleviates the DNA – damage checkpoint. J. Cell Sci.116 : 487- 498.